共价连接BODIPY光敏剂的聚合物纳米胶束及其靶向光动力疗效的研究

周忠厅[1] 张 权[1,2] 王胜涛[1] 蔡 颖[1] 中西秀树[1,2*] 尹 健[1,2*]

（1 糖化学与生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122；2 江南大学生物工程学院 江苏 无锡 214122）

摘要 目的：利用聚合物纳米胶束靶向输送光敏剂分子已经成为光动力治疗癌症的研究热点。方法：本研究采用原子转移自由基聚合反应合成嵌段聚合物聚丙烯酸叔丁酯-聚甲基丙烯酸缩水甘油酯（PtBA-*b*-PGMA），共聚物的一端脱除叔丁基，通过缩合反应共价键连接甘露糖分子，另一端环氧基开环引入叠氮基，并通过“click”反应共价连接氟硼二吡咯光敏剂分子，最后制备得到表面甘露糖修饰的负载光敏剂聚合物胶束。利用核磁共振氢谱仪和傅立叶变换红外光谱仪进行结构确认；通过透射电镜和动态光散射等考察其理化性质；经激光共聚焦显微镜和MTT细胞毒性实验对其甘露糖受体靶向性及光动力疗效进行考察和评价。结果：聚合物PtBA-*b*-PGMA的相对分子量为16924，其分散系数为1.36。聚合物中环氧基开环引入叠氮后在2106 cm^{-1}处出现叠氮基特征峰。经过“click”反应引入氟硼二吡咯光敏剂分子后，叠氮基特征峰消失，在1637 cm^{-1}处出现三氮唑特征峰。聚合物胶束粒径分布均一，稳定性良好。胶束平均流体力学直径为178 nm，在水溶液中粒度分布较窄（PDI=0.298）。聚合物胶束对人乳腺癌MDA-MB-231细胞和HEK293正常细胞均无暗毒性，在535 nm LED光照下对乳腺癌MDA-MB-231细胞具有较好的光动力治疗效果。结论：聚合物胶束能被MDA-MB-231癌细胞表面高表达的甘露糖受体特异性识别，并被内吞进入癌细胞内，具有较好的光动力杀伤作用。

关键词 光动力治疗 聚合物纳米胶束 靶向输送 细胞内吞 光毒性

中图分类号 Q819

光动力治疗是一项通过光动力学反应选择性破坏病变组织的全新技术[1-2]。近年来，将光动力治疗应用于癌症治疗已成为生物学领域研究的热点[3-4]。这种治疗手段主要依赖于将光敏剂输送至肿瘤部位，并在肿瘤部位集聚，通过特定波长的光进行照射，经过一系列的光化学和光生物学反应,[1] 在分子氧的参与下产生活性氧，尤其是单态氧[5]，从而氧化性破坏肿瘤细胞成分，使肿瘤细胞发生不可逆的损伤，最终使细胞凋亡或裂解，达到治疗肿瘤的目的[6]。然而光敏剂水溶性较差，且缺乏对恶性肿瘤部位的选择性[7]，其在光动力治疗中会损伤正常组织，生物利用度不高。此外，在特定波长的光照下产生的单态氧半衰期短，在肿瘤部位扩散的距离受限。为了解决以上问题需要研发出新型的光敏剂输送系统。

聚合物胶束是近年来备受关注的一种新型输送载体，主要通过两亲性分子形成具有疏水空腔内核和亲水外壳[8-9]。聚合物胶束在机体内具有良好的生物相容性和稳定性，延长负载药物在体内的循环时间[10]，但聚合物胶束并不能实现对肿瘤细胞的主动靶向作用，为了进一步改善聚合物胶束对肿瘤细胞的靶向作用，通常选择在聚合物上修饰能被肿瘤细胞表面高表达的受体特异识别的靶向分子，如抗体[12]、多肽[13]、叶酸[14]等，使聚合物胶束通过受体识别被细胞内吞进入细胞内，即实现对输送载体的靶向功能，也大大降低了对机体正常组织的毒副

国家自然科学基金(No. 51403081)；江苏省自然科学基金（No. BK20140137）

*通讯作者，电子信箱：hideki@jiangnan.edu.cn; jianyin@jiangnan.edu.cn

作用[15]。近年来，甘露糖被用于肿瘤细胞表面高表达的甘露糖受体特异性识别，从而增强输送载体对肿瘤部位的靶向识别作用已经有了许多报道[16]。但是在具有靶向性输送载体上修饰光敏剂，尤其是在具有靶向功能的聚合物上修饰光敏剂，以实现理想的光动力疗效的文章却鲜有报道。

氟硼二吡咯（BODIPY）是近年来被广泛应用的一种典型光敏剂[17-18]。该光敏剂具有较好的光稳定性，量子产率高，较大的摩尔消光系数，理想的吸收和发射波长等特性[19]。但因其疏水性和缺乏对肿瘤细胞的靶向性，导致将其应用于癌症的光动力治疗受限。为了克服以上困难，本文首先制备了高分子嵌段聚合物，借助酰胺缩合反应将能被肿瘤细胞表面高表达的甘露糖受体特异性识别的甘露糖修饰在聚合物的一端，同时在另一端修饰上 BODIPY，制备得到表面甘露糖修饰的负载光敏剂聚合物胶束，并应用于光动力治疗乳腺癌实验研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

丙烯酸叔丁酯(tBA，97%)、1,1,4,7,7-五甲基-二乙烯基三胺（PMDETA，99%）、甲基丙烯酸缩水甘油酯（GMA，97%）、(+)-L-抗坏血酸钠（99%）、碳二亚胺（EDC，99%）、五水硫酸铜（98%）、2-溴丙酸甲酯(MBrP，99%）均于百灵威科技有限公司购买；D-甘露糖（D-Mannose，分析纯）购于国药集团化学试剂有限公司；溴化亚铜（CuBr，99%）、氯化亚铜（CuCl，99%），购自阿拉丁试剂公司；1-羟基苯并三唑（HOBT，99%），购自迈瑞尔试剂公司；9, 10-蒽基-双(亚甲基)二丙二酸（ABDA，90%），购自 sigma 试剂公司。

1.2 主要仪器

AVANCE 400M 型核磁共振仪，德国 Bruker 公司生产；Nexus 470 红外光谱仪（FTIR），美国 Nicolet 公司生产；Nano ZS 动态光散射仪（DLS），英国 Malvern 公司生产；Waters1515 凝胶渗透色谱（GPC）仪，美国 Waters 公司生产；JEM-2 100 透射电子显微镜（TEM），日本电子株式会社生产；激光共聚焦显微镜（CLSM），日本尼康株式会社生产。

1.3 Man-PAA-*b*-PGMA-BODIPY 的合成

1.3.1 氨基-α-D-吡喃甘露糖的合成

按照参考文献[20]制备氨基-α-D-吡喃甘露糖。

1.3.2 碘代炔基-BODIPY 的合成

按照参考文献[21-22]制备碘代炔基-BODIPY。

1.3.3 PtBA-*b*-PGMA 的合成

按照参考文献[23-24]制备嵌段共聚物 PtBA-*b*-PGMA。

1.3.4 Man-PAA-*b*-PGMA-BODIPY 的合成

称取 0.5 g PtBA-*b*-PGMA 溶解在 3 ml 无水二氯甲烷（DCM）中，密封烧瓶，在氩气保护下，向瓶中加入 1.5 ml 无水四氢呋喃(THF)，室温下搅拌反应 2 h，再向反应瓶中加入 1.5 ml 无水 THF，反应 2 h 后，向反应瓶中加入 0.5 ml H_2O，搅拌反应 3 h。终止反应，旋转蒸发除去溶剂，向反应液中加入 3 ml H_2O，冻干即可得 PAA-*b*-PGMA。

称取 200 mg 嵌段共聚物 PAA-*b*-PGMA 溶解在 20 ml 无水 N,N'-二甲基甲酰胺（DMF）中，密封烧瓶，在氩气保护下，冰浴搅拌 40 min，在室温下向反应瓶中加入 505 mg EDC，356 mg HOBT，室温搅拌 15 min，然后升温至 40 ℃反应 3 h。在冰浴条件下向反应瓶中加入 0.8 ml 三乙胺和 378 mg 氨基-α-D-吡喃甘露糖，在冰浴条件下搅拌 1 h 后，室温反应 24 h。终止反应，将反应液过滤，有机溶剂旋出，将反应液移至截留分子量为 15000 的透析袋内透析三天。透析结束后冷冻干燥，即可得 Man-PAA-*b*-PGMA。

称取 120 mg Man-PAA-*b*-PGMA

溶解于 7.5 ml 无水 DMF 中，在氩气保护下，向反应瓶中加入 42 mg 叠氮钠, 33 mg 氯化铵，在 50 ℃搅拌反应 15 h。终止反应，待反应液冷却至室温后，过滤后将有机溶剂旋出抽干，即可得 Man-PAA-*b*-PGMA-N_3。

量取 3 ml 蒸馏水于 20 ml 样品瓶中，通氩气鼓泡 10 min 除去水溶氧，氩气保护下，加入 17 mg 五水硫酸铜，搅拌溶解后，加入 45 mg 抗坏血酸钠，制得 A 混合溶液备用。将 60 mg Man-PAA-*b*-PGMA-N_3 溶于 5 ml 无水 DMF 中，氩气保护下，加入 53 mg BODIPY 制得 B 溶液，将反应瓶密封，将 A 混合溶液加到 B 中，70 ℃反应 48 h。终止反应，将反应液过滤除去不溶物，滤液移至透析袋（MWCO 15000）进行透析，透析三天冷冻干燥，即可得 Man-PAA-*b*-PGMA-BODIPY。

1.4 负载光敏剂的聚合物胶束单态氧的测定

单态氧的生成对于成功制备负载光敏剂的聚合物胶束是一个非常重要的参数。使用 ABDA 作为单态氧生成的捕获剂，它能够被生成的单态氧氧化使荧光吸收强度降低，从而表征负载光敏剂的聚合物胶束单态氧的生成。称取 1 mg ABDA 溶于 1 ml 二甲亚砜（DMSO）中，配置成 1 mg/ml 的母液待用。通过 Agilent Cary Eclipse 荧光分光光度计测定 ABDA 的最适浓度为 0.004 mg/ml，再配制 1 mg/ml 负载光敏剂的聚合物胶束水溶液，通过实验条件摸索最佳检测浓度为 0.0002 mg/ml；将配制好的 0.0002 mg/ml 负载光敏剂的聚合物胶束水溶液加到 0.004 mg/ml 的 ABDA 溶液中。在 535 nm 的 LED 光源下对溶液进行连续 0、2、4、6、8、10、12min 照射，在激发波长为 380 nm 的条件下，测定上述溶液在荧光波段（390 nm-500 nm）处的荧光光谱。

1.5 负载光敏剂的聚合物胶束的细胞内吞

将对数期生长的 MDA-MB-231 和 HEK293 两种细胞分别接种于 U-dish 中，在培养箱中孵育 24 h 使其贴壁。向 U-dish 中加入含有负载光敏剂的聚合物胶束（45 μg/ml）的培养液继续培养 24 h。移除培养液，用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液（PBS）清洗 3 次。4.0%的甲醛固定细胞后用 1 μg/ml 的 DAPI 染色。在 CLSM 下观察负载光敏剂的聚合物胶束在细胞内的分布情况，观察的激发波长为 405/561 nm，发射波长为 417-477/570-1000 nm。

1.6 负载光敏剂的聚合物胶束的光动力治疗

将对数期生长的 MDA-MB-231 和 HEK293 两种细胞分别接种于 U-dish 中，在培养箱中孵育 24 h 使其贴壁。向 U-dish 中加入含有负载光敏剂的聚合物胶束（45 μg/ml）的培养液继续培养 24 h。弃去培养液，加入 1 ml 新鲜培养基，在 535 nm 的 LED 光源下照射 50 min，移除培养液。然后用 4.0%的甲醛将细胞固定并染色。在 CLSM 观察细胞形态，观察的激发波长为 405/561 nm，发射波长为 417-477/570-1000 nm。

1.7 细胞毒性评价

采用 MTT 实验在光暗条件下评价负载光敏剂的聚合物胶束的细胞毒性。将 100 μl MDA-MB-231 或 HEK293 的细胞悬液种植于 96 孔板中，10 000 个细胞/孔。在培养箱中孵育 24 h，用 pH 7.4 的 PBS 清洗 3 次，向每孔中加入含不同浓度负载光敏剂的聚合物胶束的培养液。培养 48 h 后，移除培养液，用 pH 7.4 的 PBS 清洗 3 次，向每孔中加入 100 μl MTT 溶液（1 mg/ml）继续培养 4 h。每孔用 100 μl DMSO 替换 100 μl MTT 溶液，摇床振荡 15 min。用酶标仪在 490 nm 处测量各孔的吸光度值（*OD*）。

2　结果与分析

2.1 Man-PAA-*b*-PGMA-BODIPY 的合成

Man-PAA-*b*-PGMA-BODIPY 的合

成路线如图 1 所示。首先以 MBrP 为引发剂引发单体 tBA 聚合，得到 PtBA；再以 PtBA 作为大分子引发剂引发单体 GMA 聚合，制得嵌段共聚物 PtBA-*b*-PGMA，通过调整引发剂和单体的比例，结合核磁共振氢谱和 GPC 对其结构进行确认及分析，最终选取最适比例和分散性良好的嵌段共聚物 $PtBA_{126}$-*b*-$PGMA_{42}$，通过 GPC 测得共聚物相对分子量为 16924，其分散系数为 1.36；然后经水解反应将 PtBA 上的叔丁基脱去生成羧基，核磁氢谱如图 2（a）所示，在 5.2 ppm 处即为羧基上氢的特征峰；下一步通过酰胺缩合反应将氨基α-D-吡喃甘露糖修饰在 PtBA 的羧基端，核磁氢谱如图 2（b）所示，在 3.5～4.0 ppm 处即为甘露糖上质子氢的特征峰；接下来 PGMA 上的环氧基通过叠氮钠开环生成带有叠氮基的 Man-PAA_{126}-*b*-$PGMA_{42}$-N_3。最后通过“click”反应，将带有炔基的光敏剂 BODIPY 共价连接到 Man-PAA_{126}-*b*-$PGMA_{42}$-N_3 上，制得 Man-PAA_{126}-*b*-$PGMA_{42}$-BODIPY，核磁氢谱如图 2（c）所示，在 7.3～7.6 ppm 处即为光敏剂 BODIPY 苯环上氢的特征峰，在 8.2 ppm 处即为三氮唑上氢的特征峰，标志着 BODIPY 的成功引入和“click”反应的成功发生。

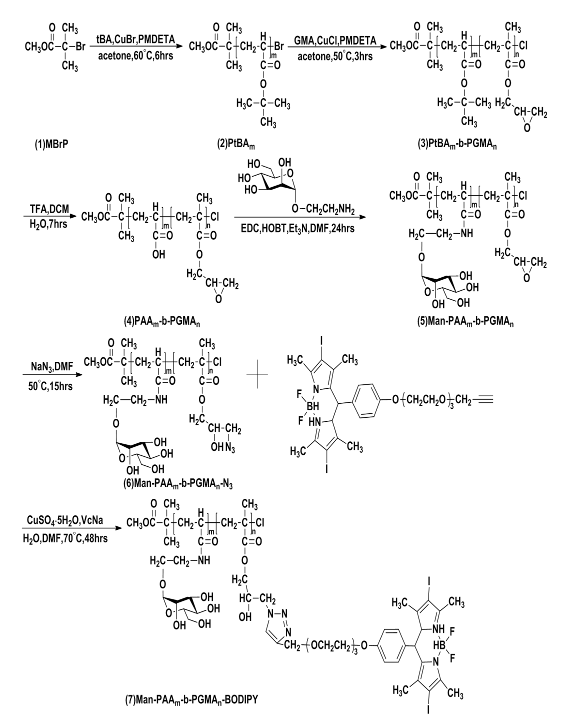
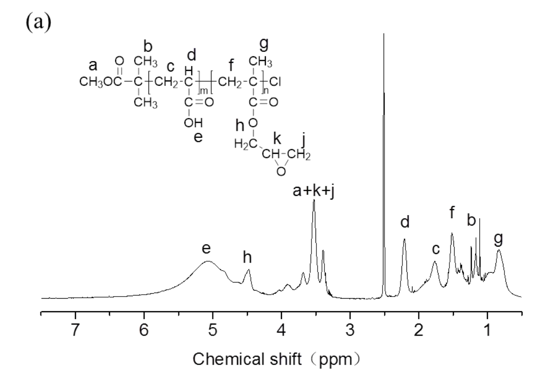


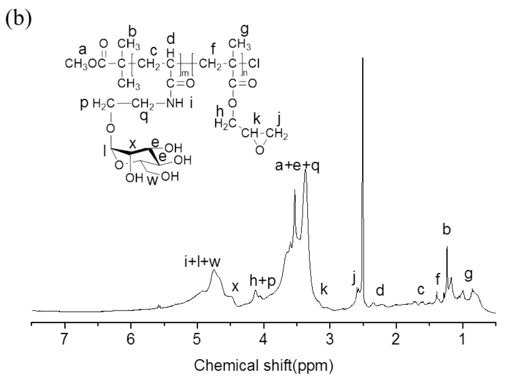
图 1 Man-PAA-*b*-PGMA-BODIPY 的合成示意图

Fig. 1 Synthetic route of the Man-PAA-*b*-PGMA-BODIPY.

(a)



(b)



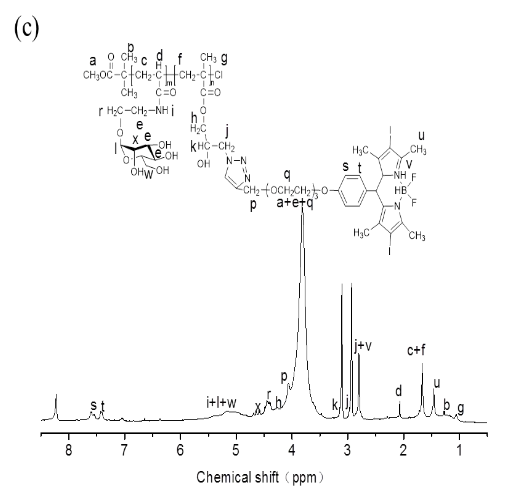


图 2 嵌段聚合物的核磁共振 ¹H NMR 谱图

Fig. 2 ¹H NMR spectra of the polymers. (a) PAA_{126}-*b*-$PGMA_{42}$. (DMSO as solvent) (b) Man-PAA_{126}-*b*-$PGMA_{42}$. (DMSO as solvent) (c) Man-PAA_{126}-*b*-$PGMA_{42}$-BODIPY. (DMF as solvent)

2.2 负载光敏剂的聚合物胶束的 FTIR 分析

如图 3（a）所示，在 1720 cm^{-1} 处出现较强的伸缩振动峰，即为 $PtBA_{126}$-*b*-$PGMA_{42}$ 的 C=O 伸缩振动峰，经水解后生成 PAA_{126}-*b*-$PGMA_{42}$，如图 3（b）所示，在 1740 cm^{-1} 处出现较明显的伸缩振动峰，即水解后生成的羧基特征峰；然后 PAA_{126}-*b*-$PGMA_{42}$ 通过酰化反应将氨基α-D-吡喃甘露糖引入生成 Man-PAA_{126}-*b*-$PGMA_{42}$，如图 3（c）所示，在 1670 cm^{-1} 处出现明显的伸缩振动峰，即生成的酰胺键的特征峰；随后 Man-PAA_{126}-*b*-$PGMA_{42}$ 上的环氧基通过叠氮钠开环生成带有叠氮基的 Man-PAA_{126}-*b*-$PGMA_{42}$-N_3，如图 3（d）所示，在 2106 cm^{-1} 处明显的看到伸缩振动峰，即叠氮基的特征峰；最后 Man-PAA_{126}-*b*-$PGMA_{42}$-N_3 通过“click”反应，将带有炔基的光敏剂 BODIPY 成功引入生成 Man-PAA_{126}-*b*-$PGMA_{42}$-BODIPY，如图 3（e）所示，在 2106 cm^{-1} 处的特征峰消失，在 1637 cm^{-1} 处出现较明显的伸缩振动峰，即三氮唑的特征峰，从而标志着“click”反应的成功发生和负载光敏剂的聚合物胶束的成功合成。

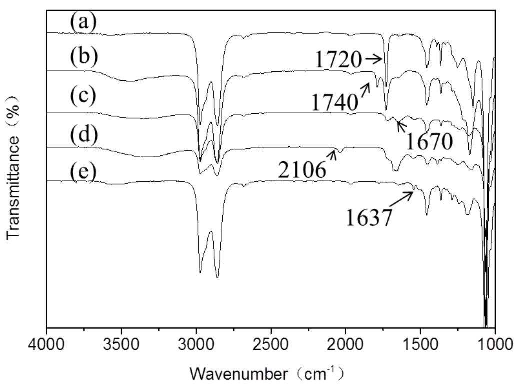


图 3 嵌段聚合物的红外光谱

Fig. 3 FT-IR spectra of the polymers. (a) $PtBA_{126}$-*b*-$PGMA_{42}$. (b) PAA_{126}-*b*-$PGMA_{42}$. (c) Man-PAA_{126}-*b*-$PGMA_{42}$. (d) Man-PAA_{126}-*b*-$PGMA_{42}$-N_3. (e) Man-PAA_{126}-*b*-$PGMA_{42}$-BODIPY.

2.3 负载光敏剂的聚合物胶束的 TEM 和 DLS 表征

通过 TEM 观察负载光敏剂的聚合物胶束的形貌，结果见图 4（a），负载光敏剂的聚合物胶束呈球形且粒径分散均匀，分散性良好。通过 DLS 测定负载光敏剂的聚合物胶束的流体力学直径，结果见图 4（b），负载光敏剂的聚合物胶束在水溶液中粒度分布较窄（PDI =0.298），其流体力学直径为 178 nm。

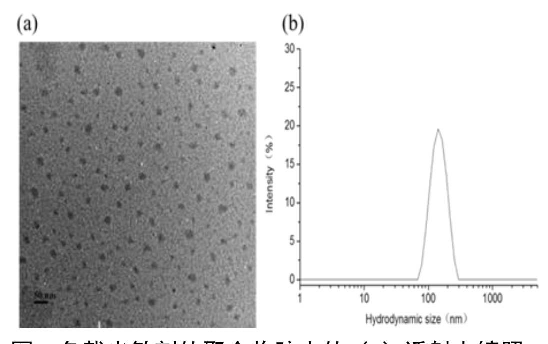


图 4 负载光敏剂的聚合物胶束的（a）透射电镜照片和水溶液中的（b）流体力学直径分布

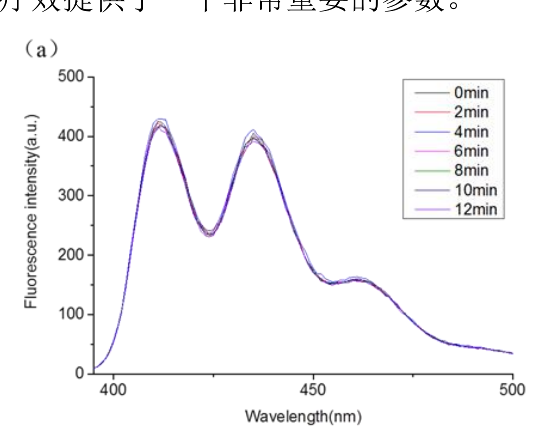
Fig. 4 The (a) TEM image of Man-PAA_{126}-*b*-$PGMA_{42}$-BODIPY and its (b) diameter and distribution.

2.4 负载光敏剂的聚合物胶束产单态氧研究

单态氧的产生是对光敏剂的光动力疗效评估所必不可少的参数。负载光敏剂的聚合物胶束在特定波长光照

下产生的单态氧能将单态氧的捕获剂 ABDA 氧化。使 ABDA 荧光强度在 400-490 nm 的吸收峰减弱，进而间接证明负载光敏剂的聚合物胶束在特定波长光照下产生单态氧。由图 5（a）可知，单态氧捕获剂在 535 nm 的 LED 光照下不会产生单态氧。由图 5（b）可知，负载光敏剂的聚合物胶束在 535 nm 的 LED 光照下产生的单态氧将捕获剂 ABDA 氧化，其荧光猝灭，从图中明显的看出随着照射时间的延长，单态氧不断产生。以上实验结果证明，负载光敏剂的聚合物胶束在特定波长光照下产生单态氧，为理想的光动力疗效提供了一个非常重要的参数。

（a）



（b）

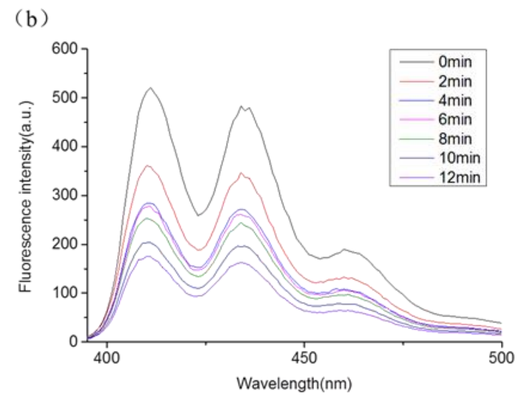


图 5 不同时长（0、2、4、6、8、10、12 min）光 (535 nm, 20 mW/cm^2)照下 ABDA 的荧光光谱图（波长范围 390~500 nm）。（a）ABDA 的 DMSO 溶液，（b）ABDA+ Man-PAA$_{126}$-*b*-PGMA$_{42}$-BODIPY 的 DMSO 溶液

Fig. 5 Fluorescence spectra (between 390 and 500 nm) of ABDA in DMSO (a) and ABDA plus Man-PAA$_{126}$-*b*-PGMA$_{42}$-BODIPY in DMSO (b) irradiated with a 535 nm LED light (20 mW/cm^2) in varied time.

2.5 甘露糖受体介导的细胞内吞

通过 CLSM 考察负载光敏剂的聚合物胶束的细胞内吞作用，结果见图 6。选取 MDA-MB-231 和 HEK293 两种细胞作为细胞内吞实验研究的细胞模型，分别与负载光敏剂的聚合物胶束培养，再选取一组同样的 MDA-MB-231 细胞先进行甘露糖封堵，再与负载光敏剂的聚合物胶束进行培养；细胞核经 DAPI 染色后呈蓝色，BODIPY 自身发红色荧光，因此，负载光敏剂的聚合物胶束呈红色。如图 6（a）所示，未经甘露糖封堵的 MDA-MB-231 细胞内出现红色荧光，且在红色荧光和蓝色荧光叠加部分较明显，说明负载光敏剂的聚合物胶束被 MDA-MB-231 癌细胞大量摄取进入细胞内。如图 6（b）所示，被甘露糖封堵后 MDA-MB-231 癌细胞表面的甘露糖受体大量减少，从而在 MDA-MB-231 癌细胞内基本没有出现红色荧光，该现象与未被封堵的 MDA-MB-231 癌细胞形成较明显的差异。如图 6(c)所示，由于在 HEK293 正常细胞表面的甘露糖受体低表达，导致 HEK293 细胞内出现的红色荧光较弱。上述实验结果证明了负载光敏剂的聚合物胶束能够被 MDA-MB-231 癌细胞表面的甘露糖受体特异性识别内吞进入到细胞，而细胞表面甘露糖受体低表达的 HEK293 正常细胞只摄取少量的负载光敏剂的聚合物胶束。

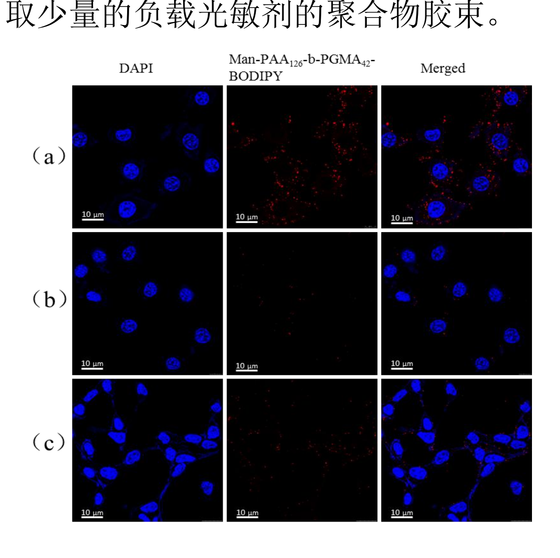


图 6 MDA-MB-231 癌细胞，甘露糖封堵的 MDA-MB-231 癌细胞和 HEK293 正常细胞分别对 Man-PAA$_{126}$-*b*-PGMA$_{42}$-BODIPY 的摄取情况

Fig. 6 Celluar uptake of Man-PAA$_{126}$-*b*-PGMA$_{42}$-BODIPY. (a) MDA-MB-231 cancer cells. (b) MDA-MB-231 cancer cells with mannose competition. (c) HEK293 normal cells.

2.6 负载光敏剂的聚合物胶束的光动力治疗的研究

细胞水平上的光动力疗效，是评价光敏剂光疗性能的重要参数。通过 CLSM 对经光暗条件处理的 MDA-MB-231 癌细胞和 HEK293 正常细胞进行形态的考察和评价。如图 7 所示：图 7（a）未经 535 nm LED 灯光照，细胞核大小均一且圆润，图 7（b）经 LED 光照 50 min 后，可以看到与图 7（a）呈现明显的差异，其细胞核严重蜷缩且被破坏。图 7（c）经 LED 光照 50 min，其细胞形态未发生破坏。以上实验结果证明负载光敏剂的聚合物胶束对 MDA-MB-231 癌细胞具有良好的光动力治疗效果，经 535 nm LED 灯光照后，其诱导产生的单态氧对 MDA-MB-231 癌细胞具有较大的杀伤作用。

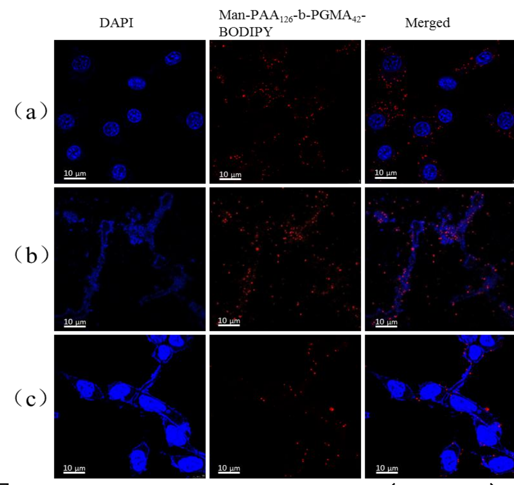


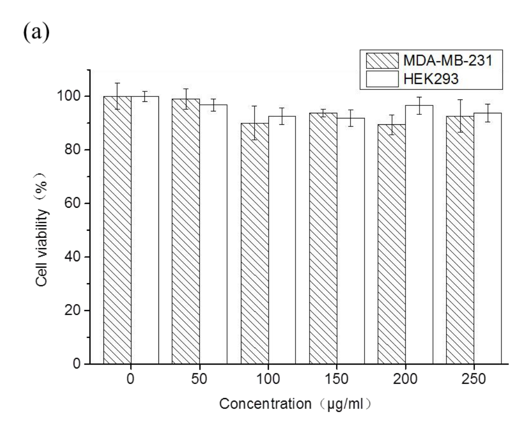
图 7 Man-PAA$_{126}$-*b*-PGMA$_{42}$-BODIPY（45 μg/ml）与 MDA-MB-231 癌细胞共培养 24 h 暗环境（a）和光照 50 min（b），与 HEK293 正常细胞共培养 24 h 光照 50 min (c)的激光共聚焦显微镜照片。

Fig. 7 CLSM images of PDT with Man-PAA$_{126}$-*b*-PGMA$_{42}$-BODIPY micelles (45μg/ml). (a) MDA-MB-231 cancer cells in dark, (b) MDA-MB-231 cancer cells and (c) HEK293 with 535 nm LED irradiation.

2.7 负载光敏剂的聚合物胶束的细胞毒性评价

采用 MTT 法考察负载光敏剂的聚合物胶束在光暗条件下对 MDA-MB-231 和 HEK293 两种细胞的细胞毒性，以评估负载光敏剂的聚合物胶束的生物相容性及光动力治疗疗效。分别配制五种浓度的负载光敏剂的聚合物胶束：0、50、100、150、200、250 μg/ml，将培养的细胞分为 A 组和 B 组，两组细胞培养 24 h 后加入不同浓度的负载光敏剂的聚合物胶束溶液继续培养 24 h，A 组通过酶标仪统计细胞存活率，B 组在 535 nm 的 LED 灯下照射 30 min，通过酶标仪统计细胞存活率。结果如图 8 所示，由图 8（a）可知，负载光敏剂的聚合物胶束溶液浓度达到 250 μg/ml，两种细胞存活率仍在 90%以上，说明负载光敏剂的聚合物胶束对 MDA-MB-231 癌细胞和 HEK293 正常细胞无暗毒性，生物相容性较好。由图 8（b）可知，两组细胞经光照后随着胶束溶液浓度的不断增大，MDA-MB-231 癌细胞存活率不到 20%，而 HEK293 正常细胞存活率仍在 85%以上，结果显示负载光敏剂的聚合物胶束能被 MDA-MB-231 癌细胞表面高表达的甘露糖受体特异性识别进入细胞内，而细胞表面甘露糖受体低表达的 HEK293 正常细胞只摄取少量的负载光敏剂的聚合物胶束。以上实验结果证明，负载光敏剂的聚合物胶束对肿瘤细胞具有较好的靶向识别作用，且该胶束在特定波长的光照下通过产生的单态氧对肿瘤细胞具有较理想的杀伤作用，可作为潜在的光敏剂应用于癌症的光动力治疗。

(a)



(b)

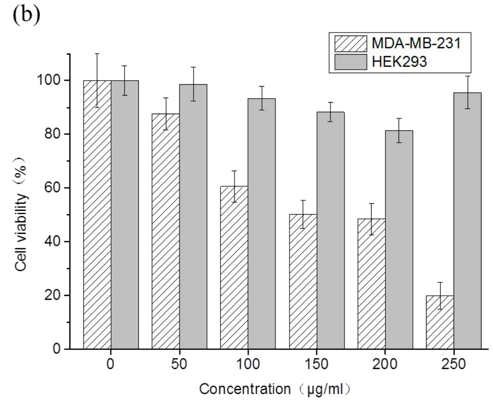


图 8 在不同浓度下 Man-PAA$_{126}$-*b*-PGMA$_{42}$-BODIPY 与 MDA-MB-231 癌细胞和 HEK293 正常细胞共培养 24 h 后的细胞存活率 (a) 和在 535 nm LED 灯照射 30 min 后细胞存活率 (b)。

Fig. 8 Viability of MDA-MB-231 cells and HEK293 cells after 24h of incubation with Man-PAA$_{126}$-*b*-PGMA$_{42}$-BODIPY doses followed by irradiation with a 535 nm LED light for 30 min (b) or incubation in the dark(a).

3 讨论

本研究合成嵌段聚合物 PtBA$_{126}$-*b*-PGMA$_{42}$，在聚合物的一端修饰上甘露糖，另一端通过共价键连接上 BODIPY，利用嵌段聚合物上的亲疏水片段形成负载光敏剂的聚合物纳米胶束。通过研究负载光敏剂的聚合物胶束的形貌特征，粒径大小，并考察其对 MDA-MB-231 癌细胞和 HEK293 正常细胞的光动力疗效。结果显示，负载光敏剂的聚合物胶束能被 MDA-MB-231 癌细胞表面高表达的甘露糖受体特异性识别内吞进入细胞，在 LED 灯照射下，负载光敏剂的聚合物胶束对 MDA-MB-231 癌细胞具有较好的杀伤作用，而对 HEK293 正常细胞毒性作用较小。因此，所制备的具有靶向功能和光动力疗效的负载光敏剂的聚合物胶束有望成为一种理想的新型光敏分子胶束，应用于癌症的光动力治疗。

参考文献

[1] Tian J, Ding L, Xu H J, et al. Cell-specific and pH-activatablerubyrin-loaded nanoparticles for highly selective near-infrared photodynamic therapy against cancer. Journal of the American Chemical Society, 2013, 135(50) : 18850-18858.

[2] Garland M J, Cassidy C M, Woolfson D, et al. Designing photosensitizers for photodynamic therapy: strategies, challenges and promising developments. Future Med Chem, 2009, 1(4) : 667-691.

[3] Huang L, Li Z J, Zhao Y, et al. Ultralow-power near infrared lamp light operable targeted organic nanoparticle photodynamic therapy. J Am Chem Soc, 2016, 138(44) : 14586-14591.

[4] 付怀秀，于翔，康宏向,等. Photosan 脂质立方液晶纳米光敏剂的制备及光动力杀伤效应研究. 中国生物工程杂志, 2015, 35(3) : 35-41.
Fu H X, Yu X, Kang H X, et al. Preparation of photosensitizer-loaded cubic liquid crystalline and its photodynamic therapy effects. China Biotechnology, 2015. 35(3) : 35-41.

[5] Tang C Y, Liao Y H, Tan G S, et al. Targeted photosensitizer nanoconjugates based on human serum albumin selectively kill tumor cells upon photo-irradiation. RSC Adv, 2015, 5(62) : 50572- 50579.

[6] Ge Y, Weng X, Tian T, et al. A mitochondria-targeted zinc(II) phthalocyanine for photodynamic therapy. Rsc Advances, 2013, 3(31) : 12839-12846.

[7] Lu Z, Zhang X, Wu Z, et al. BODIPY-based macromolecular photosensitizer with selective recognition and enhanced anticancer efficiency. Rsc Advances, 2014, 4(37) : 19495-19501.

[8] Liu Z J, Yao P. Versatile Injectable supramolecular hydrogels containing drug loaded micelles for delivery of various drugs. Polymer Chemistry, 2014, 5(3) : 1072-1081.

[9] Meng Q B, Kou Y Y, Ma X, et al. Tunable self-assembled peptide amphiphile nanostructures. Langmuir, 2012, 28(11) : 5017-5022.

[10] Zhang Y, Wang C, Xu C, et al. Morpholino-decorated long circulating polymeric micelles with the function of surface charge transition triggered by pH changes. Chemical Communications, 2013, 49(66) : 7286-7288.

[11] Liu T J, Liu S, Sheng S H, et al. EPR effect of amphiphilic copolymer micelles observed by fluorescent imaging. Chem Res Chin Univ, 2011, 27(4) : 628-634.
[12] Noh T H, Kook Y H, Park C Y, et al. Block Copolymer micelles conjugated with anti-EGFR antibody for targeted delivery of anticancer drug. Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry, 2008, 46(22) : 7321-7331.
[13] Danhier F, LeBreton A, Preat V. RGD-based strategies to target alpha(v) beta(3) integrin in cancer therapy and diagnosis. Molecular Pharmaceutics, 2012, 9(11) : 2961-2973.
[14] Prabaharan M, Grailer J J, Pila S, et al. Folate-conjugated amphiphilic hyperbranched block copolymers based on Boltorn® H40, poly(l-lactide) and poly(ethylene glycol) for tumor-targeted drug delivery. Biomaterials, 2009, 30(16) : 3009-3019.
[15] Wang S T, Zhang Q, Ye Z, et al. D-mannose-conjugated polymeric micelles for targeted drug delivery. Chin J Biotech, 2016, 32(1) : 84−94.
汪舒婷, 张权, 叶舟, 等. D-甘露糖修饰聚合物胶束的制备及其在靶向药物输送中的应用. 生物工程学报, 2016, 32(1): 84−94.
[16] Ye Z, Zhang Q, Wang S T, et al. Tumour-targeted drug delivery with mannose-functionalized nanoparticles self-Assembled from amphiphilic β-cyclodextrins. ChemEur J, 2016, 22(43) : 15216-15221.
[17] Liu L, Fu L, Jing T, et al. pH-triggered polypeptides nanoparticles for efficient BODIPY imaging-guided near infrared photodynamic therapy. Acs Applied Materials & Interfaces, 2016, 8(14) : 8980-8990.
[18] Kamkaew A, Lim S H, Hong B L, et al. BODIPY dyes in photodynamic therapy. Chem Soc Rev, 2013, 42(1) : 77-88.
[19] Zhang Q, Cai Y, Wang X J, et al. Targeted photodynamic killing of breast cancer cells employing heptamannosylated β-cyclodextrin-mediated nanoparticle formation of an adamantine-functionalized BODIPY photosensitizer. Acs Applied Materials & Interfaces, 2016, 8(49) : 33405-33411.
[20] Kaya E, Gutsmiedl K, Vrabel M, et al. Synthesis of threefold glycosylated proteins using click chemistry and genetically encoded unnatural amino acids. Chembio Chem, 2009, 10(18) : 2858-2861.
[21] Lu G, Lam S, Burgess K. An iterative route to "decorated" ethylene glycol-based linkers. Chemical Communications, 2006, 2006(15) : 1652-1654.
[22] Ke M R, Yeung S L, Ng D K, et al. Preparation and in vitro photodynamic activities of folate-conjugated distyryl boron dipyrromethene based photosensitizers. Journal of Medicinal Chemistry, 2013, 56(21) : 8475-8483.
[23] Qin J, Jiang X, Gao L, et al. Functional polymericnanoobjects by cross-linking bulk self-assemblies of poly(tert-butylacrylate)-block-poly(glycidylmethacrylate).Macromolecules, 2010, 43(19) : 3103-3109.
[24] Frenzel R, Höhne S, Hanzelmann C, et al. Tunable hydrophilic or amphiphilic coatings: A "reactive layer stack" approach. Acs Applied Materials & Interfaces, 2015, 7(23) : 12355-12366.

Polymeric Nanomicelles Conjugated with BODIPY-based Photosensitizers for Targeted Photodynamic Therapy

ZHOU Zhong-ting[1] ZHANG Quan[1,2] WANG Sheng-tao[1] CAI Yin[1] NAKANISHI Hideki[1,2] YIN Jian[1,2]

(1 Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry & Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract Objectives: Polymeric nanomicelles have attracted more attention since it could become a targeted delivery system of photosensitizers for cancer photodynamic therapy (PDT). Methods: The poly(butyl acrylate)-*block*-poly(glycidyl methacrylate) (PtBA-*b*-PGMA) copolymer was first synthesized by atom transfer radical polymerization. After the tert-butyl group was removed from PtBA-*b*-PGMA, mannose was covalently linked via amide reaction. Finally, BODIPY-based photosensitizers were introduced by the “click” reaction to obtain polymeric nanomicelles (Man-PAA-b-PGMA-BPDIPY). Structure of Man-PAA-b-PGMA-BPDIPY was

confirmed by ^1H NMR and FT-IR. The size and morphology of Man-PAA-*b*-PGMA-BODIPY was characterized by transmission electron microscopy and dynamic light scattering. The cytotoxicity, cellular uptake and PDT effects of Man-PAA-*b*-PGMA-BODIPY were investigated by MTT assay and confocal laster scanning microscope. Results: The relative molecular weight of PtBA-*b*-PGMA is 16924, and the dispersion coefficient is 1.36. The appearance of a peak at 2106 cm^{-1} in the FTIR spectrum of Man-PAA-*b*-PGMA-N_3 indicates successful grafting of azide groups onto the polymer. This peak disappeared and a new peak at 1637 cm^{-1} was observed after azide-alkyne cycloaddition "click" chemistry, indicating the formation of triazole bonds in Man-PAA-*b*-PGMA-BODIPY. Polymeric nanomicelles have uniform size distribution and excellent stability in aqueous solution. The average hydrodynamic diameter of polymeric nanomicelles is 178 nm with a narrow size distribution (PDI=0.298). Man-PAA-*b*-PGMA-BODIPY did not exhibit toxicity against MDA-MB-231 and HEK293 cells in the dark, while the enhanced phototoxicity was observed on MDA-MB-231 cancer cells under 535 nm LED irradiation. Conclusions: Man-PAA-*b*-PGMA-BODIPY was efficiently internalized by MDA-MB-231 cancer cells through receptor-mediated endocytosis, while HEK293 normal cells showed much lower endocytosis towards micelles under the same conditions. Thus, Man-PAA-*b*-PGMA-BODIPY shows its potential for targeted PDT of cancer.

Keywords Photodynamic therapy Polymeric nanomicelles Targeted delivery Endocytosis Phototoxicity